

ÉRTEKEZÉSEK EMLÉKEZÉSEK

ALFÖLDI LAJOS

BAKTÉRIUM
PROTOPLASZTOK
FÚZIÓJA,
PERSPEKTÍVÁK
ÉS PROBLÉMÁK



30

AKADÉMIAI KIADÓ, BUDAPEST

ÉRTEKEZÉSEK
EMLÉKEZÉSEK

ÉRTEKEZÉSEK EMLÉKEZÉSEK

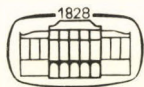
SZERKESZTI
TOLNAI MÁRTON

ALFÖLDI LAJOS

BAKTÉRIUM
PROTOPLASZTOK
FÚZIÓJA,
PERSPEKTÍVÁK
ÉS PROBLÉMÁK

AKADÉMIAI SZÉKFOGLALÓ

1982. NOVEMBER 16.



AKADÉMIAI KIADÓ, BUDAPEST

A kiadványsorozatban a Magyar Tudományos Akadémia 1982. évi CXLII. Közgyűlése időpontjától megválasztott rendes és levelező tagok székfoglalói — önálló kötetben — látnak napvilágot.

A sorozat indításáról az Akadémia főtitkárának 22/1/1982. számú állásfoglalása rendelkezett.

ISBN 963 05 3968 3

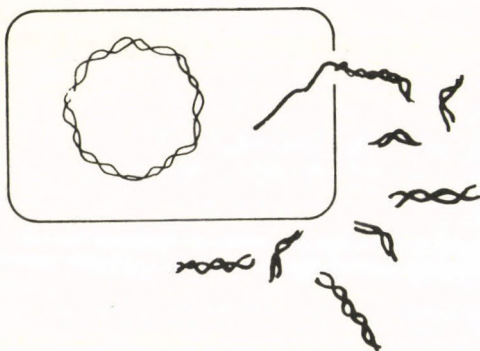
© Akadémiai Kiadó, Budapest 1985, Alföldi Lajos

Printed in Hungary

Az elmúlt évtizedek a biológiai forradalom kibontakozásának időszakát jelentik. Ebben a folyamatban a baktériumok genetikai tanulmányozása kulcsszerepet játszott. A baktériumok genetikájának tanulmányozása tette ugyanis lehetővé többek között a dezoxiribonukleinsav (DNS) információhordozó szerepének a felismerését, a génműködés szabályozásának a megértését, a fehérjeszintézis mechanizmusának felderítését.

A baktériumgenetika művelését pedig három, ma már „klasszikusnak” nevezett technika, a transzformáció, a transzdukció, a konjugáció bevezetése tette széles körűvé. Mindezen eljárások során az egyik baktériumból a másikba genetikai információt juttattunk át, s a recipiens sejtben lejátszódó genetikai történéseket vizsgáljuk és értelmezzük.

A transzformáció során a donor baktériumból a DNS-t kivonjuk, tisztítjuk, s a recipiens baktériummal a tisztított DNS-t felvételjük (1. ábra). A transzdukció során a donor baktérium DNS-ének egy-egy darabja egy-egy fág részecske DNS-ébe épül be, a donorból kiszabadult fág részecskékkel recipiens baktériumot fertőzünk meg, s így a fág egyik baktériumból a másikba bakteriális genetikai információt visz

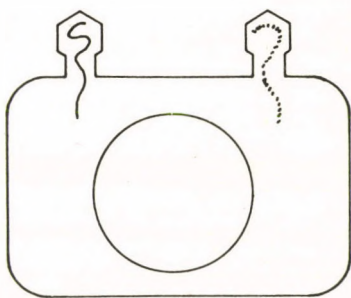


1. ábra. Transzformáció

A tisztított DNS-t (∞) a baktérium felveszi, és ezzel új genetikai információ jut be a baktériumba.

át (2. ábra). Konjugációról beszélünk akkor, amikor két megfelelő polaritású baktérium összetapadása után a donorból (F^+ , Hfr) a recipiensbe (F^-) a DNS-fonál egy része közvetlenül jut át (3. ábra).

Bármennyire is nagyszerűek azonban az ezekkel a technikákkal elért kutatási eredmények, azonnal nagy nehézségekkel találjuk magunkat szemben a baktériumgenetika művelésében, ha az alapkutatási célra használt baktériumfajok (legfeljebb 10—20 faj) mellett vizsgálatainkba a tízezres nagyságrendben előforduló egyéb fajokat is be akarjuk vonni. A transzformáció, transzdukció, konjugációval való genetikai információ-átvitel lehetősége



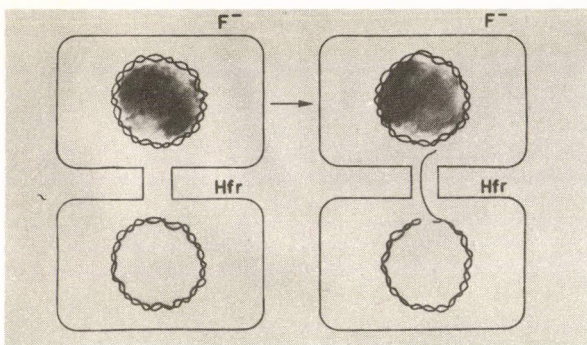
2. ábra. Transzdukció

A bakteriofág részecske (ϕ) baktériumeredetű DNS-t (ξ) juttat be az általa megfertőzött baktériumba.

ugyanis csak igen kevés faj természetes adottsága.

A most bemutatásra kerülő kísérletsorozat elindításának is egyik motiváló faktora az volt, hogy ipari szakemberek gyakran megkérdezték tőlünk, mikor lehet már a mikrobiális genetika új eredményeit gyakorlati célra széleskörűen felhasználni.

Miután a genetikai analízis legfőbb akadályát minden új faj esetében elsősorban a már említett információ-átviteli mechanizmusok működésének hiánya okozta, ha a problémát meg akartuk oldani, az egyes fajok természetes adottságától független, általánosan alkalmazható genetikai információ-átviteli eljárást kellett találnunk. Ilyen lehetőségek mérlegelése során gondoltunk a baktérium



3. ábra. Konjugáció

A donor (Hfr) és a recipiens baktérium (F^-) összetapad, majd a donor DNS-e átjut a recipiensbe.

protoplasztok indukált fúziójára, mint általánosan alkalmazhatónak látszó eljárásra.

Protoplasztoknak a sejtfaluktól megfosztott baktériumokat nevezik, amelyek csak az ún. sejtmembránnal vannak körülhatárolva. Először Tomcsik és munkatársa (1952) tapasztalta, hogy amikor egy pálca alakú *Bacillus* sejtfalát enzimatikusan eltávolították, gömb alakú képletek keletkeztek, amelyek azonnal szétpukkantak.

Weibull fedezte fel (1953), hogy ezek a gömb alakú, sejtfaluktól megfosztott baktériumok stabilan fenntarthatók, s osztódás kivételével minden egyéb életjelenségüket megtartják, ha megfelelően magas ozmolaritású tápfolyadékban vannak. Ő adta ezeknek a képződmények-

nek a protoplaszt nevet. Azóta kiderült, hogy minden szilárd sejtfallal rendelkező mikroorganizmusból, tehát baktériumból, fonalas és hasadó gombából, sőt növényi sejtéből is készíthetők protoplasztok. Megfelelő feltételek biztosítása esetén a protoplasztok felszínén a sejtfal újraképződik.

A protoplasztok indukálható fúziója is egy ismert eljárás volt már munkánk kezdetén. Ez a technika Harris és munkatársa kísérletéig vezethető vissza, akik az emlőssejtek indukált fúzióját írták le (Harris, 1965). A jó hatásfokkal működő protoplasztfúziós munkák kezdetét Kao és Michayluk közleménye jelenti, akik polietilénglikol (PEG) segítségével növényi protoplasztok nagy gyakoriságú fúzióját tudták létrehozni (1974). Fonalas gombák protoplasztjainak PEG segítségével történő fúzióját pedig Ferenczy Lajos és munkatársai 1975-ben közölték.

Amikor tehát a baktériumok protoplasztjainak indukált fúziója segítségével kívántuk megoldani egy általánosan használható genetikai információ-átviteli technika kidolgozását, úgy véltük, hogy reális lehetőségeket képzelünk el.

Ennek ellenére a megoldás mégsem volt ilyen egyszerűnek tekinthető. A baktériumok protoplasztjai ugyanis még az említett körülmények között is igen érzékeny kép-

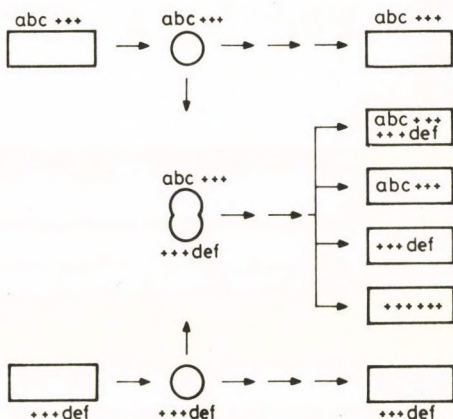
ződmények, a legkisebb környezeti változás szétesésüket és pusztulásukat eredményezheti. Nem lehetett tehát előre látni, hogy valóban indukálhatóak-e fúzióra. Még nagyobb nehézséget jelentett az a tény, hogy a baktérium protoplasztok bakteriális formává történő visszaalakulásáról csak igen szórványos és el-
lentmondó adat állott az irodalomban rendelkezésre. Márpedig bakteriális alakká való visszaalakulás nélkül a genetikai analízis végzése nehezen képzelhető el. De ha még a protoplasztok vissza is alakulhatnak bakteriális formává, eléggé valószínűtlennek látszott, hogy a fuzionált protoplasztok is képesek lesznek erre.

Mindezek mérlegelése alapján mégis úgy döntöttünk, hogy érdemes megkísérelni elképzelésünk kísérletes ellenőrzését.

Az elképzelt fúziós rendszer elméleti sémáját a 4. ábra szemlélteti. Ennek gyakorlati megvalósítása során a következő megfontolásokkal éltünk.

Bár azt mondtuk, hogy elvileg bármely baktérium átalakítható protoplaszt formába, mégis a fúziós rendszer kidolgozásához olyan baktériumfajt kellett választani, amelyről eleve sokat tudtunk.

A baktériumgenetikai munkák legismertebb objektuma az *E. coli*. Logikusnak látszott tehát először a *coli* használatát mérlegelni. A *coli* azonban az a baktérium, amely természetes



4. ábra. Egy feltételezett fúziós rendszer sémája

A genetikailag egymástól különböző szülői baktériumok ($abc+++$ és $+++def$) protoplasztá alakíthatóak, illetőleg baktérium-formává visszaalakíthatók. A két szülői protoplaszt fúziójából ugyancsak visszanyerhetőek baktériumok, amelyek között a legkülönbözőbb genotípusúak megjelenése várható.

adottságánál fogva konjugációs, transzdukciós, még transzformációs technika segítségével is tanulmányozható. Ha tehát ebben a rendszerben akartuk volna bebizonyítani a protoplasztfúziós információ-átviteli mechanizmus lehetőségét, nagyon nehéz lett volna kizárni az előbb említett mechanizmusok valamilyen speciális megnyilvánulását. Továbbá a *coli* és az összes többi ún. Gram-negatív baktérium protoplasztjai nehezen előállíthatóak, önmagukban is problematikus képződmények. A *coli* és a

Gram-negatív baktériumok csoportja tehát nem látszott a legszerencsésebb modellrendszernek.

Maradt tehát az ún. Gram-pozitív baktériumok csoportja. Ezek közül a *Bacillus*ok, különösen pedig a *B. megaterium* és *B. subtilis* ugyancsak széleskörűen ismert és alkalmazott laboratóriumi vizsgálatobjektumok. A két baktériumfaj választásunk szempontjából figyelembe vett tulajdonságait az 1. táblázat szemlélteti.

Végül is a *B. megaterium* mellett döntöttünk, mert ennek a baktériumfajnak semmi néven nevezendő genetikai információ-átviteli mechanizmusa nem volt ismeretes, viszont kitűnően átalakítható protoplasztokká. Éppen ezért úgy véltük, hogy ezen baktérium protoplasztjaival elért bármi eredmény, még ha az nem is lenne protoplasztfúzió, érdeklődésre trathatna

1. Táblázat

	<i>B. megaterium</i>	<i>B. subtilis</i>
Protoplasztta történő átalakíthatósága	jó	jó
Protoplaszt baktériumformává történő visszaalakíthatósága	nem ismert	ismert
Genetikai információ-átviteli mechanizmusa	nem ismert	transzformáció transzdukció

számot. Az a tény, hogy a *megaterium* protoplasztok bakteriális formává történő visszaalakíthatósága sem volt ismert, ugyancsak előnyösnek látszott, mert azt is bizonyítani szerettük volna, hogy egy ismeretlen rendszerben a protoplasztok visszaalakíthatóságának a kérdése nagyobb nehézség nélkül megoldható.

Csak később tudtuk meg aztán, hogy velünk egy időben hasonló mérlegelés eredményeként Pierre SCHAEFFER professzor Franciaországban és Rollin HOTCHKISS professzor az Egyesült Államokban szintén a protoplasztfúziós technika kidolgozását határozták el. Hasonlóképpen a *B. megaterium* és *B. subtilis* között válogattak, s végül is a *B. subtilis* mellett döntöttek abból kiindulva, hogy annak jól ismert genetikai információ-átviteli rendszerei a későbbi genetikai munkákban jó kontroll-adatokkal szolgálhatnak, valamint előnyösnek tartották, hogy a protoplasztok visszaalakításának módszere ismert volt.

Utólag mérlegelve a külföldi és saját döntés logikáját, úgy véljük, hogy mindegyik racionális a maga módján.

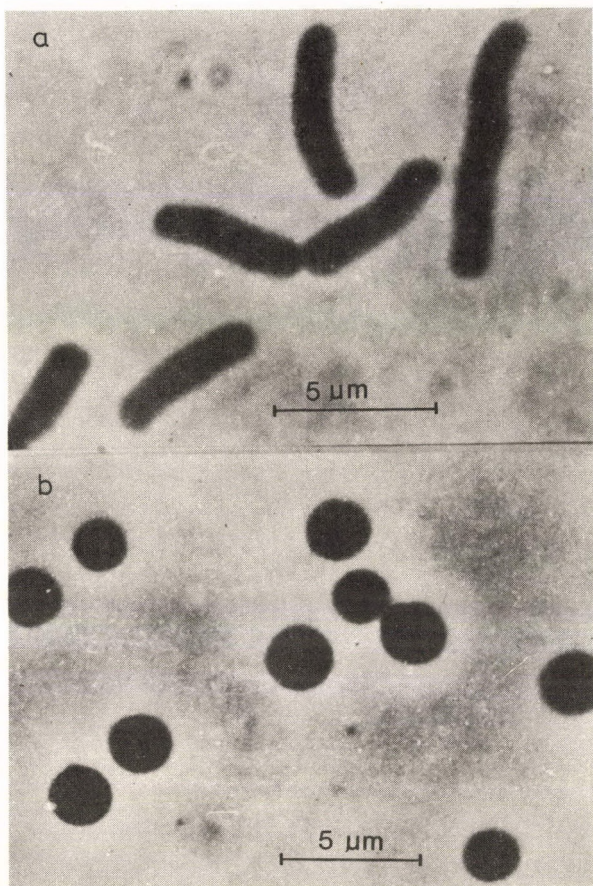
Most pedig, mielőtt a kísérletek egyes részleteinek ismertetését elkezdeném, bemutatom munkatársaimat, FODOR Katalint, HADLACZKY Gyulát, ROSTÁS Katalint, dr. CSANÁDYNÉ Lippai Lillát, akik az elképzeléseim

megvalósításában részt vettek, s akiknek lelkes munkájáért köszönettel tartozom.

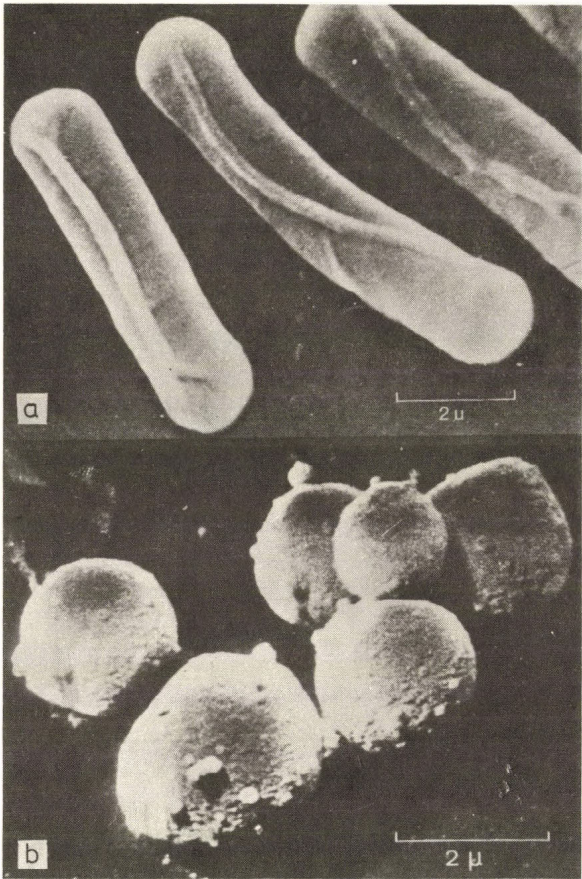
Ugyancsak munkatársaknak lehet tekinteni a *B. megaterium* különböző törzseit, amelyeket laboratóriumunkban genetikai jelzésekkel (antibiotikum-rezisztencia, auxotrófia stb.) láttunk el az előkészítő munka során. Az 1. képen egy *B. megaterium* törzs baktérium- és protoplaszt-változatának mikroszkópos és a 2. képen elektronmikroszkópos felvétele mutatja, hogy a pálcikaszerű baktérium sejtfalának enzimes eltávolítása után gömb alakú képletté alakul át.

Amint előbb már említettem, munkánk kezdetén a *B. megaterium* protoplasztok baktérium-formává történő visszaalakíthatósága kétséges volt. Az irodalomban ugyanis találunk olyan közleményeket, amelyek a *B. megaterium* protoplasztok osztódását leírták, de egyetlenegy sem, amely a sejtfal újraképződéséről és a baktérium-formává történő visszaalakulásról számolt volna be.

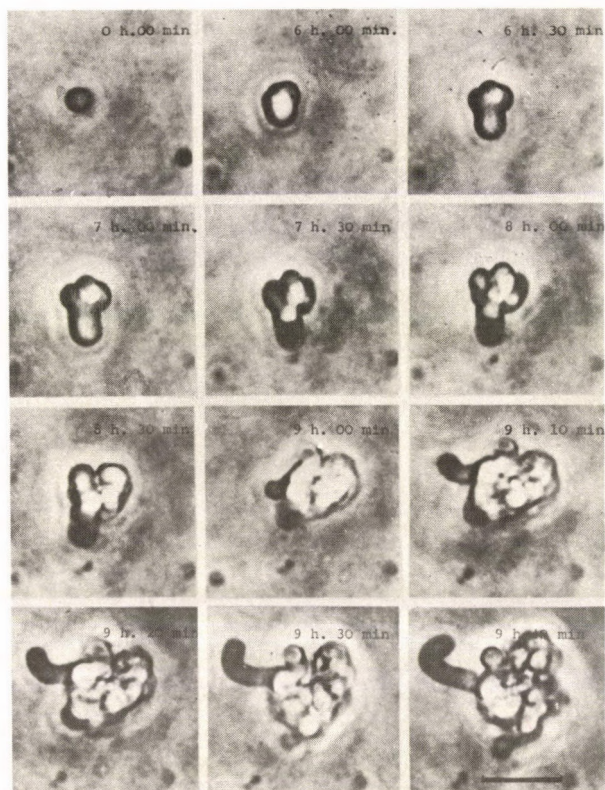
Rövidesen sikerült azonban azokat a feltételeket megtalálnunk, ahol a protoplasztok baktériummá visszaalakultak (Fodor, Hadlaczký, Alföldi, 1975). Az eljárás technikai részleteinek ismertetése helyett itt most csak egy olyan felvételsorozatot mutatok be, amely egyetlen protoplaszt visszaalakulása során lejátszódó eseményeket szemlélteti (3. kép).



1. kép. *Bacillus megaterium*: baktériumok (a) és protoplasztokká átalakított baktériumok (b).
Fáziskontraszt-mikroszkópos kép.



2. kép. *Bacillus megaterium*: baktériumok (a) és protoplasztokká átalakított baktériumok (b).
Scanning elektronmikroszkópos kép.



3. kép. Egy *Bacillus megaterium* protoplaszt baktérium-formává történő visszaalakulásának időbeli lépései.
Fáziskontraszt-mikroszkópos felvétel.

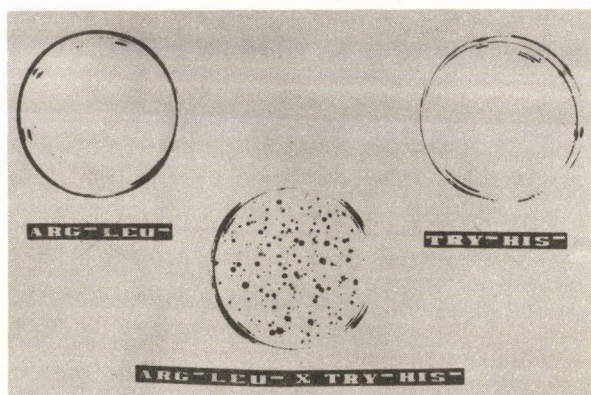
Meglepetésnek számított az a tény, hogy az első sejtfallal rendelkező pálcika-alak csak a protoplaszt jó néhány osztódása után jelenik meg (Hadlaczky, Fodor, Alföldi, 1976). Számunkra

azonban a leglényegesebb eredmény mégiscsak az volt, hogy a protoplasztok baktériumformává történő reverziója valóban lehetséges volt, s így a fúziós kísérletnek ez a feltétele is rendelkezésünkre állott.

A fúziós kísérlethez ezek után két aminosavdependens (auxotróf) törzset választottunk ki. Az egyik csak arginin és leucin, a másik csak triptofán és hisztidin jelenlétében nőtt. Genetikai jelöléssel tehát a *B. megaterium* Arg^- , Leu^- , Try^+ , His^+ törzset kívántuk fuzionálni a *B. megaterium* Arg^+ , Leu^+ , Try^- , His^- törzsszel. A fúzió indukálására különböző technikákkal való próbálkozás után végül is a polietilénliglikolt (PEG) gondoltuk legalkalmasabbnak, amellyel Kao és Michayluk növényi protoplasztok, Ferenczy Lajos és munkatársai pedig gomba protoplasztok fúzióját sikerrel indukálták.

Miután az első törzs csak arginin és leucin, a második csak triptofán és hisztidin jelenlétében képes szaporodni, egy olyan táptalajon, amelyik aminosavat nem tartalmaz, egyik törzs sem fog nőni. Egy ilyen aminosav nélküli táptalajon azonban az esetleges protoplaszt-fúzióból származó prototróf rekombinánsokat (amelyek Arg^+ , Leu^+ , Try^+ , His^+ tulajdonságúak, tehát minden aminosav jelenléte nélkül nőni képesek) közvetlenül ki lehet mutatni.

A 4. kép azt szemlélteti, hogy a két auxotróf *megaterium*-törzs PEG kezelése után minimál táptalajon valóban megjelentek a várt rekombináns telepek. Miután a megfelelő kontrollkísérletek során kizártuk, hogy ezek a rekombináns telepek transzformációs, konjugációs vagy transzdukciós mechanizmus alapján keletkeztek volna, arra a következtetésre jutottunk, hogy sikerült a PEG kezeléssel olyan protoplaszt-fúziót indukálnunk, amelyből a baktérium-formává, s ráadásul genetikailag rekombináns baktériummá történő visszaalakulás lehetséges (Fodor, Alföldi, 1976).

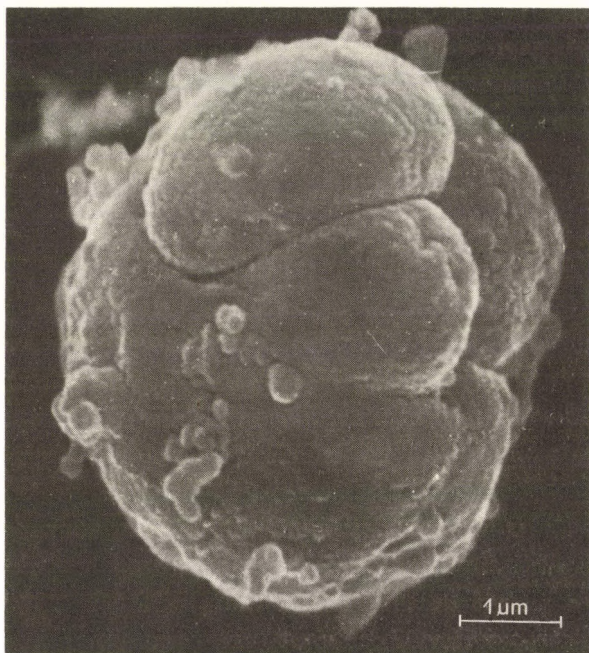


4. kép. A *Bacillus megaterium* Arg^- , Leu^- és a *B. megaterium* Try^- , His^- törzsek protoplasztjainak keverékét polietilénlikollal (PEG) kezeltük.

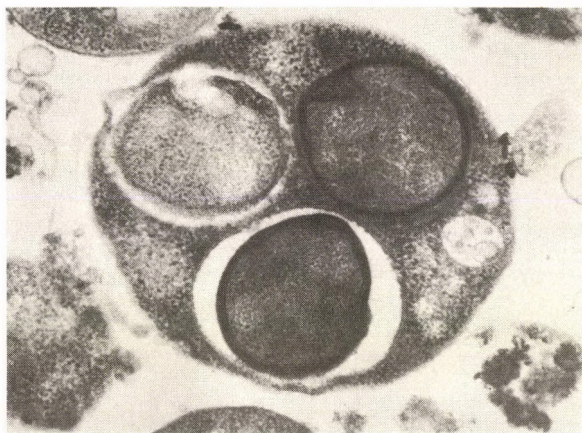
A kép a szelektáló táptalajon kinövekvő prototróf telepeket mutatja (középen).

Velünk egy időben Schaeffer, Cami, Hotchkiss (1976) hasonló eredményt értek el a *B. subtilis* rendszerben.

A protoplasztfúzió tényét hamarosan elektronmikroszkópos felvétellel közvetlenül szemléltetni nem is lehetett. Az 5. képen a *B. megaterium*, a 6. képen pedig a *B. subtilis*-ről



5. kép. *Bacillus megaterium* PEG-kezelés után fuzionáló protoplasztjai
(Hadlaczký Gyula scanning elektronmikroszkópos felvétele).



6. kép. *Bacillus subtilis* PEG-kezelés hatására fuzionált protoplasztjainak metszete egyszerre több prespórát tartalmaz (Prof. P. Schaeffer anyagából).

készült felvétel látható. A *subtilis*-ről készített képen (amelyet P. Schaeffer bocsátott rendelkezésemre) különösen szépen látszik az, hogy egyetlen protoplaszton belül több (pre-)spóra van jelen. Miután a baktérium citoplazmában csak egyetlen spóra képződhet, a több spórát tartalmazó protoplaszt csak fúzió eredményeként jöhetett létre.

Munkánk eredményének megjelenése után számos más baktérium protoplasztfúziós rendszerét írták le. Itt csak Hopwood és munkatársai munkáját említem meg (1977), akik a *Streptomyces coelicolor* fúziós rendszerének a

kidolgozásával igazolták az eljárás *streptomyces*-rendszerre való alkalmazhatóságát. Az első ipari törzsekkel létrehozott protoplasztfúzióról pedig a Gyógyszeripari Kutató Intézet munkatársai számoltak be (Szvoboda és mtsai., 1980).

Sikerült tehát a *B. megaterium* modell-rendszeren a baktérium protoplasztok fúziós rendszerét kidolgozni, s ahogy vártuk, ez a fúziós technika más baktériumok esetében is működőképes. Meg kell még itt említenem, hogy a fonalas gombák és élesztők protoplasztjainak számos fúziós rendszerét Ferenczy Lajos és munkatársai a nemzetközi mezőnyben elsőként dolgozták ki. Ferenczy Lajos 1981-ben megjelent dolgozata, a mikrobiális fúziós rendszerek legteljesebb összefoglalása.

Bármennyire is alapvető lépést jelentett azonban a fúziós technikának a baktériumgenetikába történt bevezetése, alkalmazása során számos előre nem látható probléma is jelentkezett.

A genetikai analízis számára pl. a legnagyobb nehézséget az jelenti, hogy a fúziós esemény után lejátszódó történések egymásutánjáról nincsen megfelelő ismeretünk. A fúzió utáni fiziológiai és genetikai események egymást valószínűleg úgy átfedik, hogy a szokásos genetikai analízis nem ad egyértelmű eredményt. Kapunk ugyan a fúziós elegyből

nagy gyakorisággal új genetikai kombinációkat, de azok között a különböző genotípusok megoszlása ellentmondásos.

A nagy gyakorisággal keletkező új kombinációk a gyakorlat számára már így is fontosak, mert a véletlenszerűen kapott populációból (a nagy gyakoriság következtében) relatíve könnyen ki tudják válogatni az iparilag fontos új változatokat. Nem ilyen egyszerű azonban a helyzet, ha fúziós technika segítségével genetikai analízist kívánunk végezni.

A genetikai analízis segítségével ugyanis egy adott baktérium genomjáról minél tökéletesebb képet szeretnénk kapni. Első lépésként rendszerint megszerkesztünk egy géntérképet, amelyen az adott baktérium génjeinek egymáshoz való viszonyát, sorrendjét, távolságát tüntetjük fel. Egy tökéletesen ismeretlen genom-szerkezetű baktérium genetikai analízise tehát mindig géntérképezéssel kezdődik.

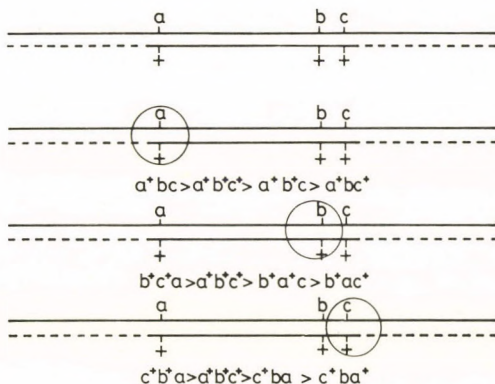
A *B. megaterium* ilyen ismeretlen genomú baktérium lévén, első lépésként mi is egy géntérképet szerettünk volna szerkeszteni.

A géntérképkészítés legegyszerűbb módja az ún. kapcsoltsági analízis elvégzése. Az eljárás lényege az, hogy a két szülő genetikai állományának kombinációjából keletkező új változatok közül kiválasztunk néhányat (direkt vagy indirekt szelekció révén), majd azt vizsgáljuk, hogy a szelektált tulajdonságokhoz más,

ún. nem szelektált tulajdonságok milyen gyakorisággal csatlakoznak. Ebből a gyakoriságból aztán következtetni lehet az adott génnek egymástól való relatív távolságára, illetve az egymáshoz viszonyított helyzetére. (A kapcsoltsági analízis elvét az 5. ábra szemlélteti.) A kapcsoltsági analízis molekuláris alapját az ún. átkeresztezés (crossing over) során bekövetkező genetikai állománycsere képezi, amikor is közeli gének nagyobb gyakorisággal jelennek meg együtt, mint a távoliak. Tudnunk kell tehát, hogy a mindig aktuálisan vizsgált rekombináns genomja mely információit kapta a másik szülő genomjából.

A klasszikus bakteriális információ-átviteli mechanizmusok során egyértelműen beszélhetünk recipiens és donor genomról. A transzformáció, transzdukció, konjugáció során ugyanis az információ-átadás mindig egyirányú, a donorból a recipiensbe. A szelektált új kombináció tehát mindig a recipiens genomjába beépült donor információtól származik.

A fúziós folyamat során azonban a két szülő teljes citoplazmája egyesül egymással, s így ott a két teljes genom egyszerre van jelen. A genetikai állomány kicserélődése ugyan reciprok folyamat, de a szelekció után megkapott rekombináns egyedről mégsem tudjuk megmondani, hogy genomjában melyek az idegen informá-



5. ábra. A kapcsoltsági analízis elve

Ha egy abc genotípusú szülőbe ennek a három markernek megfelelő vad alléleket bejuttatjuk (8 + + +), szelektálhatunk olyan utódokat, amelyek egy vad allélt megkaptak (a^+ , vagy b^+ vagy c^+). A szelekciót a markerek bekarikázása jelzi. A szelektáló táptalaj összeállításánál azt úgy egészítjük ki, hogy a másik két marker akár beépült a recipiens szülőbe, akár nem, mindenképpen kapunk növekedést. A következő lépésben ellenőrizzük a szelektált baktérium genotípusát, amely ebben az esetben bármely szelekciónál négyféle lehet. Az egyes genotípusok előfordulásának egymáshoz viszonyított gyakorisága attól fog függeni, hogy a tanulmányozott markerek egymáshoz viszonyítva milyen helyzetet foglalnak el a kromoszómán, illetve milyen távol esnek egymástól. Ezen elv alapján egy ismeretlen génelrendeződés a kapott értékekből visszakövetkeztethető.

ciók. (A kérdés részletesebb kifejtése jelentős időt igényelne, ezért ettől most eltekintek.)

Úgy gondoltuk tehát, hogy ha a fúziós rendszerrel megbízható genetikai eredménye-

ket akarunk kapni, akkor abban az információ-átadást egyirányúvá kell tennünk.

Többféle próbálkozás után végül is az információ-átadást úgy tettük egyirányúvá, hogy az egyik szülői protoplasztot hőkezeléssel regenerációra alkalmatlanná tettük, inaktiváltuk. Hasonló elvet írtak le Levi és munkatársai a *B. subtilis* rendszerben, ahol az egyik szülőt streptomycinnel ölték el (Levi és mtsai., 1977). Feltételeztük, hogy egy ilyen rendszerben csak a nem kezelt szülő lesz képes regenerációra, azaz a kapott rekombinánsok létrejöttében a regeneráló szülő teljes genomja mint recipiens, az inaktivált szülő genomja pedig mint donor vesz részt. Azt tapasztaltuk, hogy egy ilyen rendszer valóban működik (Fodor, Demiri, Alföldi, 1978). (A gyakorlat számára ez a lehetőség rendkívül hasznos, mert ipari munkákban is kívánatos gyakran az egyik szülő kizárása a további osztódásokból.)

A 2. táblázatban ilyen egyirányúsított információ-átviteli kísérlet adatait mutatom be. A donor baktériumtörzs protoplasztjait inaktiváltuk. A recipiens törzsnek hármassav-aminosavigénye volt. A szelektáló táptalajból egy aminosavat mindig kihagytunk, a másik kettőt pedig beletettük. Így az adott szelektáló táptalajon mindig csak az a rekombináns nőhetett ki, amely a donortól az adott aminosavszintetizáló képesség génjét megkapta. E szelektált tulaj-

donság génjének megkapása mellett közömbös volt, hogy a másik két aminosav szintézisének a génjeit is megkapta-e, mert hiszen ezek az aminosavak a táptalajban eleve a baktérium rendelkezésére álltak.

Ebben a rendszerben tehát egy második lépésben megvizsgálhattuk, hogy a szelektált tulajdonság génjéhez a nem szelektáltak milyen kombinációban és milyen gyakorisággal csatlakoztak. A táblázat adataiból látható, hogy bizonyos kombinációk nagyobb gyakorisággal fordulnak elő, mint mások. Genetikus szakember számára azonban az adatok mérlegelése után gyorsan nyilvánvalóvá válik, hogy azok rendkívül ellentmondásosak (Fodor, Rostás, Alföldi, 1980).

Anélkül, hogy ezeknek a részleteknek az elemzésébe kezdenék, szabad legyen itt csak annyit megemlítenem, hogy ezeket az ellentmondásokat a mai napig nem tudtuk megoldani. A fúziós technikával történő géntérképezés problematikáján tehát tovább dolgozunk.

A genetikai analízis próbálgatása során a fúziós rendszer egyéb anomáliáit is felismertük, amelyek további megoldandó feladatot jelentenek számunkra. Ezek egy része fiziológiai, más részük genetikai jellegű.

A fiziológiai jellegű kérdéscsoport abban nyilvánul meg, hogy a protoplasztok baktérium-formává történő visszaalakulása a környe-

2. Táblázat

<i>B. megaterium</i> THT Str ^R × <i>B. megaterium</i> KM Str ^S (Try ⁻ , His ⁻ , Tre ⁻) (előlt)			
		Kísérlet	
<u>Try⁺ szelekció</u>		1	2 3
Try ⁺ His ⁺ Tre ⁺		55	80 42
Try ⁺ His ⁻ Tre ⁺		6	2 1
Try ⁺ His ⁺ Tre ⁻		9	0 1
Try ⁺ His ⁻ Tre ⁻		30	18 56
Összes:	100	100	100
<u>His⁺ szelekció</u>			
Try ⁺ His ⁺ Tre ⁺		48	12 28
Try ⁻ His ⁺ Tre ⁺		26	13 12
Try ⁺ His ⁺ Tre ⁻		3	1 1
Try ⁻ His ⁺ Tre ⁻		21	13 58
Összes:	98	39	99
<u>Tre⁺ szelekció</u>			
Try ⁺ His ⁺ Tre ⁺		63	83 61
Try ⁻ His ⁺ Tre ⁺		24	12 12
Try ⁺ His ⁻ Tre ⁺		1	1 0
Try ⁻ His ⁻ Tre ⁺		9	3 25
		3	1 2
Összes:	100	100	100

Kapcsoltsági analízis

A prototróf *B. megaterium* KM törzs protoplasztjait előltük, majd ezeket a protoplasztokat a *B. megaterium* Try⁻ His⁻ Tre⁻ törzs protoplasztjaival fuzionáltuk. Szelektáltunk egy-egy rekombináns kategóriára (Try⁺; His⁺; Tre⁺), majd megvizsgáltuk, hogy az egyes szelektált markerekhez a nem szelektáltak milyen gyakorisággal csatlakoznak. A számok az összes megvizsgált telep közötti egyes kategóriák előfordulási gyakoriságát jelentik.

zeti hatásokra rendkívül érzékeny. Egyes aminosavak jelenléte a táptalajban kifejezetten gátló hatású lehet, ha egyidejűleg nincs jelen egy másik aminosav is. Miután a genetikai szelekciókban gyakran adódik olyan táptalaj-összeállítás, amikor az egymás hatását kiegyensúlyozó aminosavak külön-külön vannak ott jelen, nyilvánvaló, hogy ez a fiziológiai hatás a genetikai eredményeket eltorzíthatja (Fodor, Alföldi, 1979). Ezért ezekkel a fiziológiai hatásokkal, azok eredetével, valamint ellensúlyozásuk lehetőségeivel tovább kell foglalkoznunk.

A genetikai jellegű kérdéscsoport elméleti érdekességét az adja, hogy a baktériumok ún. haploid szervezetek, azaz a genetikai információ sejtenként egyszer fordul elő bennük. Fúzióval egy ún. diploid vagy esetleg még magasabb ploiditási szinteket hozunk létre. Ez pedig természetellenes állapot. Hogyan reagál tehát egy ilyen fúziós komplex, hogyan oldja meg a számára szokatlan helyzetet?

Eddigi eredményeink arra utalnak, hogy ilyen diploid állapot még a baktérium-formává történő visszaalakulás után is egy ideig fennmaradhat. Ezt a lehetőséget szemlélteti a 3. táblázat.

A táblázatban bemutatott kísérletben fúzióból származó baktériumokat vizsgáltunk. A fúzióból (mindegyik szülő két aminosavra auxotróf) a prototróf rekombinánsokat sze-

3. Táblázat

Táptalaj összetétele	Aminosavmentes táptalaj +			
	0	Arginin Leucin	Triptofán Hisztidin	Arginin Leucin Triptofán Hisztidin
Kinőtt telepek száma	30	62	52	63
Prototrófok	30	30	30	30
Arg ⁻ Leu ⁻		32		32
His ⁻ Try ⁻			22	22
Összes fenotípus				84

Prototróf telepek replika-módszerrel történő analízise

A *Bacillus megaterium* Arg⁻ Leu⁻ és *B. megaterium* Try⁻ His⁻ törzset fuzionáltattuk. Prototrófokat izoláltunk. 63 prototróf telepet gazdag táptalajból a táblázatban feltüntetett összetételű táptalajokra replikáztunk. Megállapítható, hogy a 63 telep közül csak 30 prototróf, 32 Arg⁻ Leu⁻; 22 pedig Try⁻ His⁻. Így a 63 telep 84 fenotípust mutat, ami csak úgy lehetséges, ha a telepek egy része többféle fenotípusú baktériumból épül fel.

lektáltuk. Majd egy izolált telepet olyan tápfolyadékba szuszpendáltunk, ahol csak a prototróf rekombináns baktériumok képesek tovább szaporodni. Az ilyen körülmények közötti szaporítást még egyszer megismételtük. Ezek után egy olyan tenyészzettel kellett rendelkezünk, amelynek minden egyes baktérium-egyede prototróf.

Kiszélesztettük tehát ezt a tenyészetet most már gazdag táptalajra, s a kinőtt izolált telepe-

ket (63 telep) a mikrobiális genetikában közismert replika-módszerrel megvizsgáltuk. Azt vártuk, hogy ebben a tesztben is minden egyes telep prototrófnak bizonyul. Ezzel szemben a telepek között szülői típusú auxotrófokat is találtunk. Továbbá, a várt 63 helyett összesen 84 fenotípust mutattunk ki.

Ezeket az eredményeket legegyszerűbben úgy értelmezhetjük, hogy a fúzió után, szelektív táptalajon fenntartott prototróf tenyészet baktériumainak egy része diploid állapotú maradt, tehát azokban mindkét szülői genom jelen volt, egymás hiány-tulajdonságát kiegészítette, komplementálta, ezért ezek a baktériumok prototrófként viselkedtek. Ezek a diploidok időnként szegregáltak haploid szülői típusokra is. A tenyészet tehát ezért tartalmaz szülői egyedeket.











A szegregáció a gazdag táptalajra való kiszélesztés után is előfordulhat. Így azok a telepek, amelyekben a szegregáló diploid baktériumok voltak jelen, mindkét szülői baktériumot tartalmazták. Ezen telepekből a replikázás után egyszerre két szelektáló táptalajon nőttek ki telepek, s ez azt eredményezte, hogy több fenotípust észleltünk, mint amennyi a vizsgált telepek száma.

Ezeknek a komplementáló, majd szegregáló diploidoknak a természete teljesen ismeretlen.

További kísérletsorozatok szükségesek a kérdés tisztázására.

Az eddig ismertetett komplementáló diploid baktériumok mellett Rollin Hotchkiss és Gábor Magda *B. subtilis* rendszerrel dolgozva, a protoplasztfúzió után keletkező egészen váratlan tulajdonsággal rendelkező baktériumokat találtak (1980). Ezeknek az általuk biparentális-(BP)-nak nevezett baktériumoknak az a jellegzetessége, hogy a két teljes szülői genom jelen van bennük, osztódás során mindkettő replikálódik és az utódokba átjut, azonban az egyik teljes genom nem fejeződik ki, nem komplementál (ezért non complementing diploid, NCD néven is jelölik azokat). Az inaktív genom aktívvá válása azonban meghatározott környezeti feltételek között létrehozható. Ha ilyen nem komplementáló diploid baktériumok valóban léteznek, azok a baktériumgenetikai kísérletek érdeklődésének a központjába fognak kerülni. Az ilyen baktérium ugyanis analógnak látszik az emlős rendszerekben megismert, ún. kromoszóma-inaktivációt mutató sejtekkel, s így a baktériummodell lehetővé tenné ennek a nehezen tanulmányozható rendszernek a vizsgálatát.

A fúziós kísérletek során észlelt diploid baktériumok tehát egy igen érdekes új rendszert jelentenek. Tulajdonságaikat a 6. ábra foglalja össze.

GENOM	FENOTÍPUS	UTÓD GENOM	MEGNEVEZÉS
		Komplementáló diploid (Stabilis)
	  	Komplementáló diploid (Szegregáló)
 vagy	  	Nem komple- mentáló diplo- id (NCD) (Biparentális)

6. ábra. Fúzióból származó diploid baktériumok
jellegzetességei

Azonos genotípus különböző fenotípusokban nyilvánulhat
meg. Az utódpopuláció összetétele is más és más lehet.

A *B. megaterium* fúziós utódai között mi is megkíséreltük ilyen biparentális egyedek kimutatását. Valóban, a Hotchkiss házaspár leírásának megfelelően viselkedő telepeket tudtunk izolálni. Kontrollkísérleteink szerint azonban a *B. megaterium* biparentális jellegzetességet mutató telepei inkább egy keverékpopulációnak látszanak, s eddig nincs semmi megbízható kísérletes bizonyítékunk, ami azt igazolná, hogy diploid baktériumegyedekből állnának.

Összefoglalva az elmondottakat, az alábbi néhány tényt szeretném hangsúlyozni.

1. Sikerült kidolgoznunk egy olyan eljárást, amelynek során baktériumok protoplasztjai fúzióra készíthetők;

2. Sikerült ezeket a fuzionált protoplasztokat baktérium-formájúvá visszaalakítani;

3. A protoplasztfúzióból nyert baktériumok genetikai analízise azt mutatja, hogy azok között valódi rekombináns baktériumok, valamint szegregáló diploid állapotú baktériumok vannak jelen;

4. A fúziós hibridbaktériumok genetikai analizálhatósága mind a mai napig megoldatlan kérdést jelent.

IRODALOM

1. TOMCSIK, J.—GUEX-HOLZER, S.: *Schweiz. Z. allg. Path. Bakt.* 15: 517 (1952).
2. WEIBULL, C.: *J. Bacteriol.* 66: 699 (1953).
3. HARRIS, H.—WATKINS, J. F.: *Nature* 205: 640 (1965).
4. KAO, K. N.—MICHAYLUK, M. R.: *Planta* 115: 355 (1974).
5. FERENCZY, L.—KEVEI, F.—SZEGEDI, M.: *Experientia* 31: 1028 (1975).
6. FODOR, K.—HADLACZKY, GY.—ALFÖLDI, L.: *J. Bacteriol.* 121: 390 (1975).
7. HADLACZKY, GY.—FODOR, K.—ALFÖLDI, L.: *J. Bacteriol.* 125: 1172 (1976).
8. FODOR, K.—ALFÖLDI, L.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 73: 2147 (1976).
9. SCHAEFFER, P.—CAMI, B.—HOTCHKISS, R. D.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 73: 2151 (1976).
10. HOPWOOD, D. A.—WRIGHT, H. M.—BIBB, M. J.—COHEN, S. N.: *Nature* 268: 171 (1977).
11. SZVOBODA, GY.—LÁNG, T.—GADÓ, I.—AMBRUS, G.—KARI, C.—FODOR, K.—ALFÖLDI, L.: In: *Adv. Protopl. Res.* (Ed. L. Ferenczy and G. L. Farkas), pp. 235. Budapest, Akadémiai Kiadó, Oxford, Pergamon Press (1980).
12. FERENCZY, L.: In: *Gen. as a Tool in Microb.* (Ed. S. W. Clover and D. A. Hopwood), pp. 1. Cambridge University Press (1981).
13. FODOR, K.—DEMIRI, E.—ALFÖLDI, L.: *J. Bacteriol.* 135: 68 (1978).
14. LEVI, C.—SANCHEZ RIVAS, C.—SCHAEFFER, P.: *FEMS Microbiol. Lett.* 2: 323 (1977).
15. FODOR, K.—ROSTÁS, K.—ALFÖLDI, L.: In: *Adv. Protopl. Res.* (Ed. L. Ferenczy and G. L. Farkas), pp. 19. Budapest, Akadémiai Kiadó, Oxford, Pergamon Press (1980).
16. FODOR, K.—ALFÖLDI, L.: *MGG* 168: 55 (1979).
17. HOTCHKISS, R. D.—GÁBOR, M. H.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77: 3553 (1980).

A kiadásért felel az Akadémiai Kiadó és Nyomda igazgatója

Felelős szerkesztő: Klaniczay Júlia

A tipográfia és a kötésterv Löblin Judit munkája

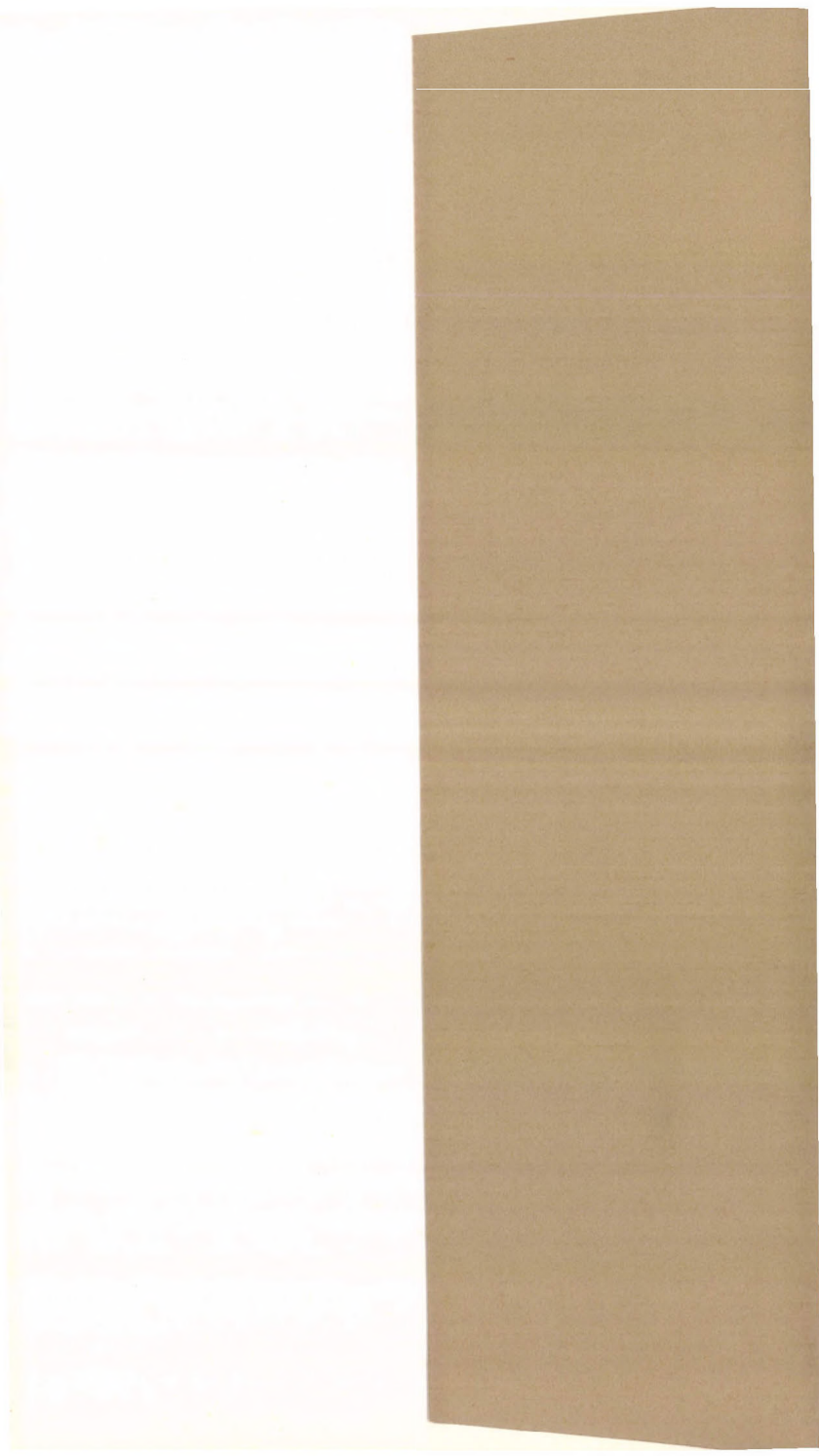
Műszaki szerkesztő: Érdi Júlia

Terjedelem: 1,8 (A/5) ív — AK 1743 k 8587

HU ISSN 0236-6258

13730 Akadémiai Kiadó és Nyomda

Felelős vezető: Hazai György



Ára: 15, - Ft